

⑫ 公開特許公報 (A)

平4-179485

⑬ Int. Cl. 5

C 12 N 15/65
5/06
15/69

識別記号

府内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)6月26日

8717-4B C 12 N 15/00
7236-4B 5/00

A

B

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全6頁)

⑮ 発明の名称 新規ベクターおよび該ベクターを用いて高発現形質転換細胞を選択する方法

⑯ 特 願 平2-305655

⑰ 出 願 平2(1990)11月9日

⑱ 発明者 宮崎 純一 熊本県熊本市東町4-2 東町南住宅3-101

⑲ 発明者 山村 研一 熊本県熊本市東町4-2 東町南住宅2-206

⑳ 出願人 宮崎 純一 熊本県熊本市東町4-2 東町南住宅3-101

㉑ 代理人 弁理士 長井 省三 外1名

明細書

1. 発明の名称

新規ベクターおよび該ベクターを用いて高発現形質転換細胞を選択する方法

2. 特許請求の範囲

- (1) 活性の弱いプロモーターの下流に、変異を持つネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子を結合したものを選択マーカーとして持つ外来遺伝子発現用ベクター
- (2) 活性の弱いプロモーターが単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターである請求項(1)記載の外来遺伝子発現用ベクター。
- (3) 動物細胞で働く自己複製配列を有する請求項(1)記載の外来遺伝子発現用ベクター。
- (4) 自己複製配列が、バビローマウィルス由来の遺伝子配列である請求項(3)記載の外来遺伝子発現用ベクター。
- (5) 請求項(1), (2), (3)または(4)項のいずれかに記載の発現ベクターに外来遺伝子を組み込み、

これにより形質転換された細胞を、 $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度のG418を含む培養液中で選択することにより、外来遺伝子を高発現する形質転換細胞を選択する方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規な発現ベクターおよび該ベクターを用いて、任意の外来遺伝子を高発現する形質転換細胞を効率良く選択する方法に関する。(従来の技術および発明が解決しようとする課題)

遺伝子組み換え技術の進歩に伴って、遺伝子組み換えを利用した有用物質の生産は近年急速に進歩して来ている。遺伝子組み換え技術を利用して外来遺伝子を発現させる場合には、適当な宿主細胞と、これに応じた外来遺伝子発現用プロモーターを有する発現ベクターが用いられる。これまでには、大腸菌や酵母など、取り扱いが容易な微生物が発現宿主細胞として広く研究されてきたが、このような微生物では外来遺伝子の発現において一部に限界があることが確認

されており、近年では高等動物培養細胞などを発現宿主細胞とした発現系が盛んに研究されている。これまで、動物細胞を宿主として、外来遺伝子を高発現させる方法として強いプロモーターを持つ発現ベクターを用いること、および細胞に導入され維持される発現ベクターDNAのコピー数を出来るだけ増加させることが考慮されて来た。後者の例として、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子(*dhfr*)を欠損したチャイニーズハムスター卵巣細胞に、選択マーカーとして*dhfr*遺伝子を持つ発現ベクターを導入し、次第に高い濃度のメソトレキセートで選択することにより、発現ベクターDNAのコピー数の増加した、外来遺伝子を高発現する形質転換細胞を得る方法がある。しかしながら、この方法は*dhfr*欠損細胞でしか効果的に使えない点と、選択とクローニングに長期間を要する点が問題である。別の方法として、ウシバビロマウィルス由来の自己複製配列を導入した発現ベクターを用いる方法がある。この方法では、細

胞に導入されたベクターはエピゾームとして維持されるが、実際は染色体に組み込まれることも多く、高発現の形質転換細胞株を頻回にクローニングする必要がある。

このように遺伝子組み換え技術を応用した有用物質の製造を実用化するためには、様々な細胞株において、外来遺伝子を高発現する形質転換細胞のみを効率良く選択する技術の開発が強く望まれている。

(発明を解決するための手段)

このような状況において、本発明者らは、従来より選択マーカーとして一般に用いられるG418耐性遺伝子(ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼII遺伝子)を用いて、高濃度のG418で選択することにより、高いコピー数で発現ベクターが組み込まれた形質転換細胞を効果的に選択する方法を考案し、それが実際に応用可能であることを確認し、本発明を完成させるに至った。この方法は、非常に弱い活性を示すように改造したG418耐性遺伝子を発現ベクターに組み込み、これで形質転換細胞を作る。さらに高濃度G418で選択することにより、多コピーの発現ベクターを組み込んだ細胞のみを効果的に残すというものである。選択マーカーとして、pSV2-neoが知られている(J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982)が、これが非常に強いG418耐性を形質転換細胞に与えるので本目的に適さない。ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼII遺伝子で、変異のために活性が

非常に低い酵素を作ることが報告されている(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87, 3435-3439, 1990)。この変異を持つ遺伝子を組み込んだプラスミドとしてpMC1neoが報告されている(Cell, 51, 503-512, 1987)。このプラスミドにおいてネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼII遺伝子はポリオーマ由来のエンハンサーに結合した単純ヘルペスウィルスのチミジンキナーゼプロモーターの下流に組み込まれ、またその3'側にはSV40ウィルス由来のポリAシグナルが結合されている。本発明ではプロモーター活性が弱いことが必要なのでポリオーマ由来のエンハンサーを除き、チミジンキナーゼプロモーターにより駆動されるネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼII遺伝子を様々な発現ベクターに組み込むためのNeoカセットとして用いている(第1図)。なお、Neoカセットに用いるプロモーターは活性の弱いものであれば他のものでよい。例として、SV40ウィルス初期遺伝子プロモーターからエンハンサーを除いたも

のなどが挙げられる。また、ネオマイシンフォースフォトランスフェラーゼII遺伝子についても活性が野生型の遺伝子より弱くなるような変異を持つものであれば他のものでもよい。

本発明の外来遺伝子発現用ベクターの基本的な構造としては、既に報告されている強力な発現ベクター、例えはpAGS-3 (Gene, 79, 269-277, 1989)に上述のNeoカセットを組み込んだものである。実施例1に示すpAGneo 3-IL2プラスミドはこれにさらにIL-2 cDNAを組み込んだものである(第2図)。

また、このような本発明の発現ベクターは、大腸菌でのクローニングを行い易くするために大腸菌プラスミド由来の遺伝子を有する。そのような大腸菌プラスミド由来の遺伝子としては、大腸菌体内で複製するためのori、並びにクローニングの際に選択マーカーとなりうる適当な遺伝子、例えはアンビシリソウや、テトラサイクリン等に対する薬剤耐性遺伝子が挙げられる。また、このような遺伝子としてプラスミドpBR 322

由来の遺伝子がよく用いられるが、この場合には、pBR 322複製開始点(ori)の近くにある、宿主細胞での複製を阻害する毒性配列(Nature, 293, 79-81, 1981)を除去することが望ましい。後述の実施例に用いた発現ベクターは、この配列を除去している。

さらに、上記の発現ベクターにウシバビローマウィルス由来の自己複製配列を組み込むことにより、高濃度G418選択後に高発現形質転換細胞をさらに効率良く得ることを可能にする。

上記のようなDNA配列から構成される本発明の好ましい発現ベクターの一例として、pABneo 3が挙げられる。これは実施例に示すpABneo 3-IL2プラスミド(第3図)から、IL-2 cDNAを除いたものに相当する。

このような発現ベクターを用いて、その持つ外来遺伝子発現用プロモーターの下流に外来遺伝子を導入したものを構築する。このような発現させたい外来遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入する宿主細胞は、外来遺伝子発現用

プロモーターがよく働くものであれば何でもよい。例として、マウスL細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、ヒトHela細胞などが挙げられる。

発現ベクター宿主細胞への導入は既知の方法、例えはリン酸カルシウム法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76, 1373-1376, 1979), DEAE-Dextran法(DNA cloning vol. II, IRL press, Oxford, 143-190, 1985), エレクトロポレーション法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 7161-7165, 1984), リポフェクション法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84, 7413-7417, 1987)等により行うことが出来る。その後、G418を200 μg/ml(力価)含む培地内で培養を続け、G418耐性形質転換細胞を得る。これらの細胞を高濃度のG418(800 μg/ml)を含む培地内で、さらに約1カ月間培養を続ける。この過程で発現ベクターを多コピー安定に導入された形質転換細胞のみが残る。これは、発現ベクターに組み込まれたNeoカセットの活性が著しく弱いため、多コピーのベクターDNAを持つ形質転換細胞のみが、高濃

度G418下で増殖しうるためと考えられた。実際、G418を200 μg/mlとして培養を続けた場合に比べ、800 μg/mlで培養を続けた場合、形質転換細胞当たりの発現ベクターのコピー数が5倍以上増加し、200~300コピーに達することが、サザーンプロット法により確認されている。また、この解析により、導入された発現ベクターは、同方向に多数が連なって染色体に組み込まれていることが確認された。導入された発現ベクターの大幅なDNA構造の変化は起こっていない。バビローマウィルス由来の自己複製配列を持つベクターでは細胞に導入された発現ベクターはエピゾームとして細胞の核内で維持されると考えられるが、1カ月以上のG418選択の後では多コピーが連なった形で最終的には染色体に組み込まれていることが、サザーン法による解析で示された。

なお、ボリオーマエンハンサーを含み、活性の強いNeoカセットを持つ発現ベクターを用いて上述と同様の操作を行った場合には高濃度G418下での培養による、多コピーの発現ベクターを組み込んだ形質転換細胞の選択は認められない。

(発明の効果)

本発明の Neo カセットを持つ新規な動物細胞用の外来遺伝子発現ベクター及びそれを用いた高発現形質転換細胞の効率的選択法により、工業的レベルの生産においても十分利用可能な形質転換細胞が長期間にわたる細胞のクローニングなしに任意の細胞株を用いて容易に得ることが可能となつた。また、本発明を用いて得られた形質転換細胞は長期にわたり安定に外来遺伝子の高発現を維持する。このような発現系は本発明により初めて確立されたので、本発明が産業界にもたらす技術的利益は非常に大きなものであると評価される。

(実施例)

本発明により効率的に、多コピーの発現ベクターを組み込んだ形質転換細胞が得られるが、実際に得られた形質転換細胞で外来遺伝子が高い発現を示すことが、外来遺伝子として、ヒト IL-2 cDNA を用いて確認されている。これらを実施例として本発明を詳細に説明する。

実施例 1：発現ベクター pABneo3-IL2 の構築

プラスミド pMC1neo (Cell, 51, 503-512, 1987) を制限酵素 EcoRI (NEB#101), BamHI (NEB#136) で消化し DNA ポリメラーゼ Klenow フラグメント (NEB#210) で末端を修復したのち、 tk プロモーター、neo、SV40 ポリ A シグナルより成る約 1 kb の Neo カセット DNA 断片をアガロースゲル電気泳動により分離した。この断片を GENECLEAN (BIO 101 Inc.) によりゲルから回収、精製した。この Neo カセットの構造を第 1 図に示す。

ニワトリ beta-アクチンプロモーターを用いた強力な発現ベクターである pAGS-3 (Gene, 79, 269-277, 1989) を制限酵素 NdeI (NEB#111) で消化し、仔牛小腸由来のアルカリリフォスファターゼの作用により脱リン酸化し、さらに DNA ポリメラーゼ Klenow フラグメントにより末端を修復した。

これを前述の Neo カセット DNA 断片と T4DNA リガーゼを用いて、連結環状化することにより、発現ベクター pAGneo3 を作製した。大阪大学細胞

実施例中のプラスミド、DNA、種々の酵素、大腸菌、培養細胞などを扱う諸操作は以下にあげる雑誌、成書を参考とした。

- (1) 遺伝子操作実験法、高木康敬、編者 (1980), 講談社
- (2) 遺伝子操作マニュアル、高木康敬、編者 (1982), 講談社
- (3) MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL. T. MANIATIS ら編、(1982), COLD SPRING HARBOR LABORATORY.
- (4) METHODS IN ENZYMOLOGY, 65巻, L. GROSSMAN ら編、(1980), ACADEMIC PRESS

なお、実施中には次の略号を用いた。

neo : ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ II
遺伝子

tk : 単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ遺伝子

BPV : ウシバビローマウィルス

kb : 1000 塩基対

CHO : チャイニーズハムスター卵巣細胞

工学センター・谷口維紹教授より供与された pZipSVIL2 プラスミドを制限酵素 BamHI (NEB#136) で消化し、アガロースゲル電気泳動し、ゲルから約 0.5 kb のヒト IL-2 cDNA を含む DNA 断片を得た。この DNA 断片はヒト IL-2 cDNA (Nature, 302, 305-310, 1983) の第 41 塩基対から第 542 塩基対を含む。この DNA 断片を DNA ポリメラーゼ Klenow フラグメントで処理し、これに BstXI アダプター (InvitrogenN408-18) を T4DNA リガーゼで結合させた。

前述の pAGneo3 プラスミドを BstXI (NEB#113) で消化し、仔牛小腸由来アルカリリフォスファターゼで脱リン酸化した後、前述のヒト IL-2 cDNA 断片と T4DNA リガーゼにより連結環状化した。このようにして、ヒト IL-2 発現プラスミド pAGneo3-IL2 を作製した。この構造を第 2 図に示す。

実施例 2：pABneo3-IL2 の作製

pdBPV-1 プラスミド (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 79, 7147-7151, 1982) を制限酵素 HindIII

(NEB #104) で消化し、これを DNA ポリメラーゼ Klenow フラグメントで処理し、T4 DNA リガーゼを用いて BamHI リンカー (NEB #1021) を結合した。これを BamHI で消化し、アガロースゲル電気泳動法により、長さ 5.4 kb の BPV のいわゆる 69% 断片を回収した。

実施例 1 で構築した pAGneo3-IL2 を BamHI で消化し、仔牛小腸由来アルカリフォスファターゼで処理し、これと前述の BPV 69% 断片と T4 DNA リガーゼで連結環状化した。このようにして、pABneo3-IL2 を構築した。この構造を第 3 図に示す。

実施例 3：マウス L 細胞におけるヒト IL-2 の產生

ファルコン 6 cm ディッシュに 1×10^5 のマウス L 細胞を撒き、翌日リポフェクチン試薬 (BRL) を用い添付のプロトコールに従い、5 μg の IL-2 発現プラスミド pAGneo3-IL2, pABneo3-IL2 をトランسفェクトした。2 日後より、力価 200

μg/ml の G418 を含む培地で 18 日間培養を続けた。その結果、pAGneo3-IL2, pABneo3-IL2 をトランسفェクトしたディッシュでともに約 200 個のコロニーが認められた。これらのコロニーをトリプシン EDTA 液でディッシュより剥がし、25 cm² フラスコ 4 本に分割し、各々のフラスコを 200, 400, 600, 800 μg/ml (力価) の G418 を含む培地中で 1 カ月間継代培養を続けた。各濃度で維持された L 細胞をファルコン細胞培養用 6 穴プレートに 1×10^5 細胞/穴ずつ撒き、G418 を含まない培地中で培養した。48 時間後、培養上清を分取し、ヒト IL-2 測定キット Quantikine (R&D Systems, #D2000) を用いて IL-2 活性を測定した。その結果、第 4 図に示すように pABneo3-IL2 で形質転換した L 細胞は 600, 800 μg/ml で選択することにより、400 μg/ml で選択した場合に比し、各々 6 倍、8 倍の高い IL-2 の発現を示した。このような高濃度 G418 選択による効果は、BPV 由来の配列を含まない場合にも明らかに認められるが、効果は少なかった。なお、エンハンサーを含む活性の強

い Neo カセットを用いて、同様の選択を行った場合には、高濃度 G418 選択の効果はほとんど認められなかった。

実施例 4：チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞におけるヒト IL-2 の產生

ファルコン 6 cm ディッシュに 2×10^5 の CHO 細胞を撒き、その後実施例 3 と同じようにトランسفェクションと G418 による選択を行い、さらに、実施例 3 と同様に產生されるヒト IL-2 の活性を測定した。pABneo-IL2 で形質転換した CHO 細胞はやはり L 細胞の場合と同様、800 μg/ml の G418 選択により、200 μg/ml の選択による場合に比し、約 6 倍の IL-2 の產生が得られた。この高い產生は、さらに 3 カ月間 800 μg/ml の G418 の存在下で培養した後も全く変わらなかった。pAGneo3-IL2 で形質転換した CHO 細胞の場合も、やはり 800 μg/ml で選択したものより高い IL-2 の発現を示したが、その効果は pABneo3-IL2 の場合より少な

かった。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、実施例 1 で構築した Neo カセットの構造を示す。変異のため 185 番目のアミノ酸残基が野生型の Glu から Asp に変わっている。

第 2 図は、実施例 1 で構築した発現ベクター pAGneo3-IL2 の構造を示す。

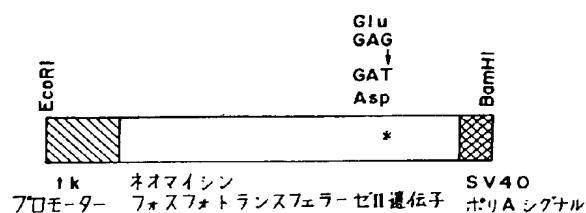
第 3 図は、実施例 2 で構築した発現ベクター pABneo3-IL2 の構造を示す。

第 4 図は、pAGneo3-IL2 および pABneo3-IL2 をマウス L 細胞にトランسفェクトし、200 μg/ml の G418 で 18 日間、形質転換細胞を選択後、さらに 200, 400, 600, 800 μg/ml の G418 存在下で 1 カ月選択を続けて得られた形質転換細胞 10⁴ 個当たり、48 時間に培養液中に分泌されるヒト IL-2 活性を測定した結果を示す。—●—, pABneo3-IL2; —■—, pAGneo3-IL2

第 5 図は、pAGneo3-IL2 および pABneo3-IL2 をチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞にト

ランスフェクトし、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ のG418で20日間、形質転換細胞を選択後、さらに $200, 400, 800\mu\text{g}/\text{ml}$ のG418存在下で1ヶ月間選択を続けて得られた形質転換細胞10⁶個当たり、48時間に培養液中に分泌されるヒトIL-2活性を測定した結果を示す。●—, pABneo3-IL2; ■—, pAGneo3-IL2

第1図

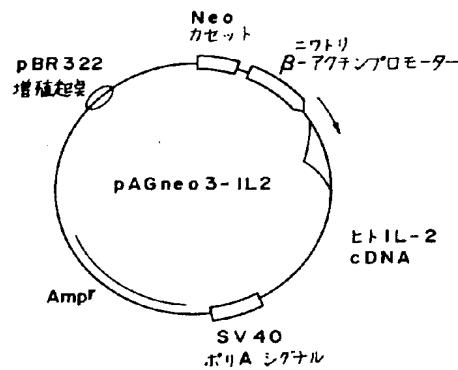


特許出願人 宮崎純一

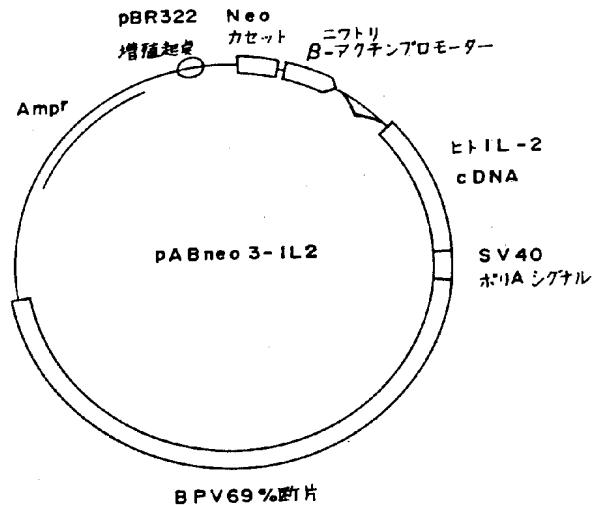
代理人 弁理士 長井省三

" " 森田拓

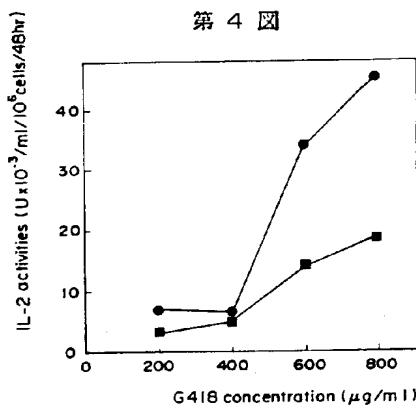
第2図



第3図



第4図



第5図

